



日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

2001年 5月31日

出願番号

Application Number:

特願2001-164774

[ST.10/C]:

[JP2001-164774]

出願人

Applicant(s):

キヤノン株式会社

2002年 3月22日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

及川耕造

出証番号 出証特2002-3019186

【書類名】 特許願

【整理番号】 4446018

【提出日】 平成13年 5月31日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C08G 63/06
C12P 7/42

【発明の名称】 側鎖にフェニルスルファニル構造を有するユニットを含むポリヒドロキシアルカノエート、及びその製造方法

【請求項の数】 28

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社
社内

 【氏名】 見目 敬

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社
社内

 【氏名】 今村 剛士

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社
社内

 【氏名】 須川 悦子

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社
社内

 【氏名】 矢野 哲哉

【特許出願人】

 【識別番号】 000001007

 【氏名又は名称】 キヤノン株式会社

【代理人】

【識別番号】 100088328

【弁理士】

【氏名又は名称】 金田 暢之

【電話番号】 03-3585-1882

【選任した代理人】

【識別番号】 100106297

【弁理士】

【氏名又は名称】 伊藤 克博

【選任した代理人】

【識別番号】 100106138

【弁理士】

【氏名又は名称】 石橋 政幸

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 089681

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

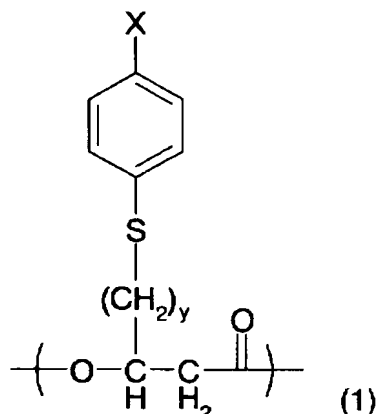
【書類名】 明細書

【発明の名称】 側鎖にフェニルスルファニル構造を有するユニットを含むポリヒドロキシアлкаノエート、及びその製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記一般式（1）：

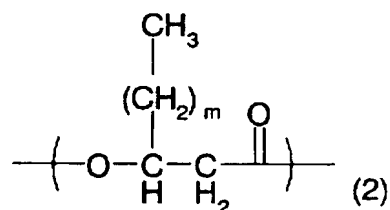
【化 1】



（式中、Xは、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、tert-ブチル基からなる群から選択されるアルキル基を表し、yは、1～7から選択される任意の整数を表し、ポリマー中において、一つ以上の値をとり得る）で示されるユニットをポリマー分子中に含むことを特徴とするポリヒドロキシアлкаノエート。

【請求項 2】 前記一般式（1）で示されるユニットに加えて、下記一般式（2）：

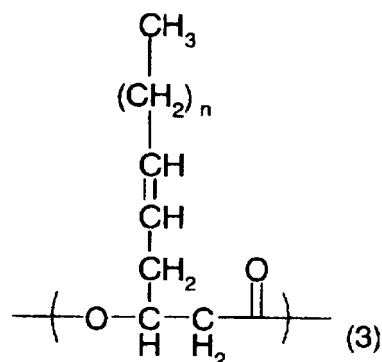
【化 2】



（式中、mは、0～8から選択される任意の整数を表し、ポリマー中において、一つ以上の値をとり得る）で示される3-ヒドロキシアлкаノ酸ユニット、ある

いは、下記一般式（３）：

【化３】

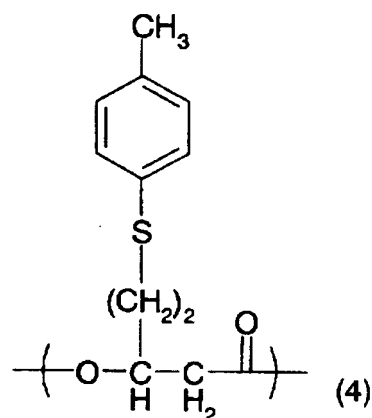


（式中、 n は、３および５から選択される任意の整数を表し、ポリマー中において、一つ以上の値をとり得る）で示される３－ヒドロキシアルカー５－エン酸ユニットのうち、少なくとも１種類をもポリマー分子中に含むことを特徴とする請求項１に記載のポリヒドロキシアルカノエート。

【請求項３】 ポリマー分子の数平均分子量は、１００００～５００００の範囲であることを特徴とする請求項１または２に記載のポリヒドロキシアルカノエート。

【請求項４】 下記化学式（４）：

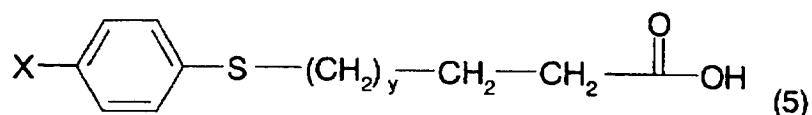
【化４】



で示される３－ヒドロキシー５－〔（４－メチルフェニル）スルファニル〕吉草酸ユニットを含むことを特徴とする請求項１～３のいずれかに記載のポリヒドロキシアルカノエート。

【請求項 5】 (工程 1) 下記一般式 (5) :

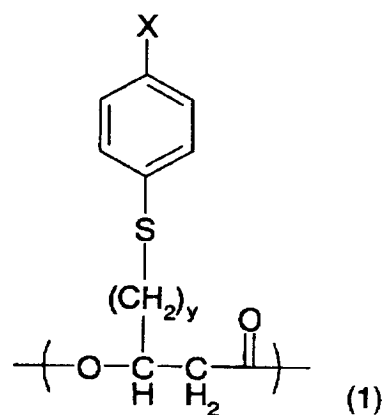
【化 5】



(式中、Xは、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、tert-ブチル基からなる群から選択されるアルキル基を表し、yは、1～7から選択される任意の整数を表す)で示される化合物を少なくとも一種以上含む培地中で、ポリヒドロキシアルカノエート産生能を有する微生物を培養する工程と、

(工程 2) 培養後、前記微生物の産生する下記一般式 (1) :

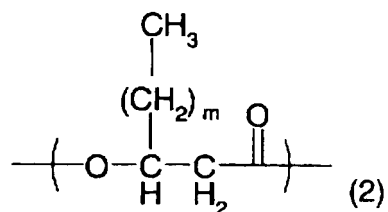
【化 6】



(式中、Xは、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、tert-ブチル基からなる群から選択されるアルキル基を表し、yは、1～7から選択される任意の整数を表し、ポリマー中において、一つ以上の値をとり得る)で示されるユニットをポリマー分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートを回収する工程とを有することを特徴とするポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

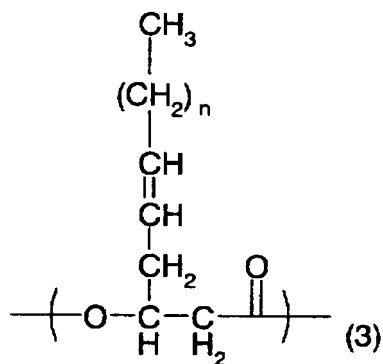
【請求項 6】 前記工程 2 において回収されるポリヒドロキシアルカノエートは、前記一般式 (1) で示されるユニットに加えて、
下記一般式 (2) :

【化 7】



(式中、mは、0～8から選択される任意の整数を表し、ポリマー中において、一つ以上の値をとり得る)で示される3-ヒドロキシアルカン酸ユニット、あるいは、下記一般式(3)：

【化 8】



(式中、nは、3および5から選択される任意の整数を表し、ポリマー中において、一つ以上の値をとり得る)で示される3-ヒドロキシアルカー5-エン酸ユニットのうち、少なくとも1種類をもポリマー分子中に含むことを特徴とする請求項5に記載の製造方法。

【請求項7】 前記工程1において利用する前記培地は、ポリペプトンを含んでいることを特徴とする請求項5または6に記載の製造方法。

【請求項8】 前記工程1において利用する前記培地は、酵母エキスを含んでいることを特徴とする請求項5または6に記載の製造方法。

【請求項9】 前記工程1において利用する前記培地は、糖類を含んでいることを特徴とする請求項5または6に記載の製造方法。

【請求項10】 培地中に含有される糖類は、グリセロアルデヒド、エリトロース、アラビノース、キシロース、グルコース、

ガラクトース、マンノース、フルクトース、グリセロール、エリトリトール、キシリトール、グルコン酸、グルクロン酸、ガラクツロン酸、マルトース、スクロース、ラクトースからなる群から選択される 1 種類以上の化合物であることを特徴とする請求項 9 に記載の製造方法。

【請求項 1 1】 前記工程 1 において利用する前記培地は、有機酸またはその塩を含んでいることを特徴とする請求項 5 または 6 に記載の製造方法。

【請求項 1 2】 前記培地中に含有される有機酸またはその塩は、ピルビン酸、リンゴ酸、乳酸、クエン酸、コハク酸、あるいはこれらの塩からなる群から選択される 1 つ以上の化合物であることを特徴とする請求項 1 1 に記載の製造方法。

【請求項 1 3】 前記工程 1 において利用する前記培地は、アミノ酸またはその塩を含んでいることを特徴とする請求項 5 または 6 に記載の製造方法。

【請求項 1 4】 前記培地中に含有されるアミノ酸またはその塩は、グルタミン酸、アスパラギン酸あるいはこれらの塩からなる群から選択される 1 つ以上の化合物であることを特徴とする請求項 1 3 に記載の製造方法。

【請求項 1 5】 前記工程 1 において利用する前記培地は、炭素数 4 から 12 の直鎖アルカン酸またはその塩を含んでいることを特徴とする請求項 5 または 6 に記載の製造方法。

【請求項 1 6】 前記工程 1 における微生物の培養は、
 (工程 1-1) 前記一般式 (5) で示される化合物を少なくとも一種類以上含み、かつポリペプトンを含む培地中で、ポリヒドロキシアルカノエート産生能を有する微生物を培養する工程と、これに続き、
 (工程 1-2) 前記一般式 (5) で示される化合物を少なくとも一種類以上含み、かつ有機酸またはその塩とを含む培地中で、工程 1-1 で培養された微生物を更に培養する工程とを有する、少なくとも二段階以上の培養で行うことを特徴とするを行なうことを特徴とする請求項 5 または 6 に記載の製造方法。

【請求項 1 7】 前記工程 1-2 で利用する培地中に窒素源が含まれていないことを特徴とする請求項 1 6 に記載の製造方法。

【請求項 1 8】 前記工程 1-2 で用いる培地中に含有される有機酸または

その塩は、ピルビン酸、リンゴ酸、乳酸、クエン酸、コハク酸あるいはこれらの塩からなる群から選択される1つ以上の化合物であることを特徴とする請求項16または17に記載の製造方法。

【請求項19】 前記工程1における微生物の培養は、

(工程1-3) 前記一般式(5)で示される化合物を少なくとも一種類以上含み、かつ糖類を含む培地中で、ポリヒドロキシアルカノエート産生能を有する微生物を培養する工程と、これに続き、

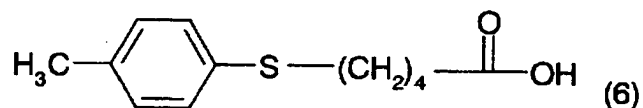
(工程1-4) 前記一般式(5)で示される化合物を少なくとも一種類以上含み、また、糖類を含み、かつ窒素源を含まない培地中で、工程1-3で培養された微生物を更に培養する工程とを有する、少なくとも二段階以上の培養で行うことを特徴とするを行なうことを特徴とする請求項5または6に記載の製造方法。

【請求項20】 前記工程1-4で利用する培地中に、窒素源が含まれていないことを特徴とする請求項19に記載の製造方法。

【請求項21】 前記糖類が、グリセロアルデヒド、エリトロース、アラビノース、キシロース、グルコース、ガラクトース、マンノース、フルクトース、グリセロール、エリトリートール、キシリトール、グルコン酸、グルクロン酸、ガラクトツロン酸、マルトース、スクロース、ラクトースからなる群から選択される1種類以上の化合物であることを特徴とする請求項19または20に記載の製造方法。

【請求項22】 工程1において、下記化学式(6)：

【化9】

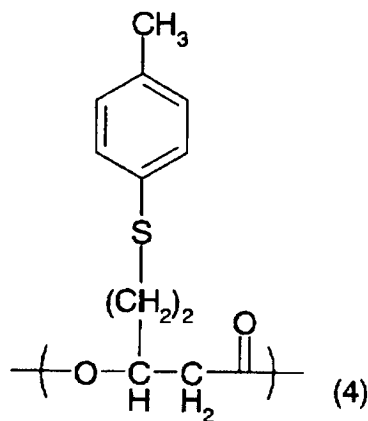


で示される5-[(4-メチルフェニル)スルファニル]吉草酸を含む培地中で微生物を培養し、

工程2において回収するポリヒドロキシアルカノエートは、下記化学式(4)

:

【化 1 0】



で示される 3-ヒドロキシ-5-[(4-メチルフェニル)スルファニル]吉草酸ユニットをポリマー分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートであることを特徴とする請求項 5～21 のいずれかに記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【請求項 23】 工程 2 のポリヒドロキシアルカノエート回収工程は、

工程 1 において培養された微生物細胞中に蓄積されるポリヒドロキシアルカノエートを抽出する工程を含むことを特徴とする請求項 5～22 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 24】 微生物が産生したポリヒドロキシアルカノエートの可溶な前記溶媒は、クロロホルム、ジクロロメタン、ジオキサン、テトラヒドロフラン、アセトニトリル、アセトンから選択される 1 種類以上の溶媒であることを特徴とする請求項 23 に記載の製造方法。

【請求項 25】 工程 2 のポリヒドロキシアルカノエート回収工程は、工程 1 において培養された微生物細胞中に蓄積されるポリヒドロキシアルカノエートを分離する工程として、微生物細胞を破碎する工程を含むことを特徴とする請求項 5～22 に記載の製造方法。

【請求項 26】 微生物細胞を破碎する工程は、超音波破碎法、ホモジナイザー法、圧力破碎法、ビーズ衝撃法、摩砕法、搗潰法、凍結融解法のいずれかの方法で行われることを特徴とする請求項 25 に記載の製造方法。

【請求項 27】 工程 1 に利用する微生物は、シュードモナス (*Pseudomonas*

)属に属する微生物であることを特徴とする請求項5～26のいずれかに記載の製造方法。

【請求項28】 前記シュードモナス (*Pseudomonas*) 属に属する微生物が、シュードモナス・チコリアイ YN2株 (*Pseudomonas cichorii* YN2; FERM BP-7375)、シュードモナス・チコリアイ H45株 (*Pseudomonas cichorii* H45; FERM BP-7374)、シュードモナス・ジェッセニイ P161株 (*Pseudomonas jessenii* P161; FERM BP-7376) のうちから選択される微生物であることを特徴とする請求項27に記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規な構成ユニットを含むポリヒドロキシアルカノエート (PHA) と、その製造方法に関する。より具体的には、PHAを生産し菌体内に蓄積する能力を有する微生物を利用し、末端に置換フェニルスルファニル基を置換基として有するアルカン酸を原料として、対応する、側鎖末端に置換フェニルスルファニル基を有する3-ヒドロキシアルカン酸ユニットを含む新規な生分解性PHAを製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

これまで、多くの微生物がポリ-3-ヒドロキシ酪酸 (以下、PHBと略す) あるいはその他のPHAを生産し、菌体内に蓄積することが報告されてきた (「生分解性プラスチックハンドブック」, 生分解性プラスチック研究会編, (株) エヌ・ティー・エス, P178-197 (1995))。これらのポリマーは、従来のプラスチックと同様に、溶融加工等により各種製品の生産に利用することができる。更に、生分解性であるがゆえに、自然界で微生物により完全に分解されるという利点を有していることから、従来の多くの合成高分子化合物のように自然環境に残留して汚染を引き起こすことがない。また、生体適合性にも優れて

おり、医療用軟質部材料等としての応用も期待されている。

【0003】

このように微生物産生PHAは、その生産に用いる微生物の種類や培地組成、培養条件等により、様々な組成や構造のものとなり得ることが知られており、これまで主に、PHAの物性の改良という観点から、このような組成や構造の制御に関する研究がなされてきた。例えば、アルカリゲネス・ユウトロファスH16株 (*Alcaligenes eutropus* H16, ATCC No. 17699) 及びその変異株は、その培養時の炭素源を変化させることによって、3-ヒドロキシ酪酸（以下、3HBと略す）と3-ヒドロキシ吉草酸（以下、3HVと略す）との共重合体を様々な組成比で生産することが報告されている（特表平6-15604号公報、特表平7-14352号公報、特表平8-19227号公報 等）。

【0004】

また、特許公報第2642937号には、シュードモナス・オレオボランス・ATCC 29347株 (*Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347) に炭素源として非環状脂肪族炭化水素を与えることにより、炭素数6から12までの3-ヒドロキシアルカノエートをモノマーユニットとするPHAを生産することが開示されている。

【0005】

特開平5-74492号公報には、メチロバクテリウム属 (*Methylobacterium* sp.)、パラコッカス属 (*Paracoccus* sp.)、アルカリゲネス属 (*Alcaligenes* sp.)、シュードモナス属 (*Pseudomonas* sp.) の微生物を、炭素数3から7の第一級アルコールに接触させることにより、3HBと3HVとの共重合体を生産させる方法が開示されている。

【0006】

特開平5-93049号公報、及び特開平7-265065号公報には、アエロモナス・キャビエ (*Aeromonas caviae*) をオレイン酸やオリブ油を炭素源として培養することにより、3HBと3-ヒドロキシヘキサン酸

との二成分共重合体を生産することが開示されている。

【0007】

特開平9-191893号公報には、コマモナス・アシドボランス・IFO 13852株 (*Comamonas acidovorans* IFO 13852) が、炭素源としてグルコン酸及び1, 4-ブタンジオールを用いた培養により、3HBと4-ヒドロキシ酪酸とをモノマーユニットに持つポリエステルを生産することが開示されている。

【0008】

更に、ある種の微生物では、様々な置換基、例えば、不飽和炭化水素、エステル基、アリル基、シアノ基、ハロゲン化炭化水素、エポキシドなどが導入されたPHAを生産することが報告されており、このような手法によって微生物産生PHAの物性改良を目指す試みもなされている。例えば、*Makromol. Chem.*, 191, 1957-1965, (1990)、*Macromolecules*, 24, 5256-5260, (1991)、*Chirality*, 3, 492-494, (1991)等では、シュードモナス・オレオボランスが3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸（以下、3HPVと略す）をモノマーユニットをして含むPHAを生産することが報告されており、3HPVが含まれることに起因すると思われる、ポリマー物性の変化が認められている。

【0009】

また、置換基を側鎖に導入したPHAのうち、近年フェノキシ基を側鎖に有するPHAの開発が盛んである。

【0010】

Macromol. Chem. Phys., 195, 1665-1672 (1994) には、シュードモナス・オレオボランス (*Pseudomonas oleovorans*) が、11-フェノキシウンデカン酸から3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸ならびに3-ヒドロキシ-9-フェノキシノナン酸をユニットとして含むPHAを生産することが報告されている。

【0011】

Macromolecules, 29, 3432-3435 (1996)

には、シュードモナス・オレオボランス (*Pseudomonas oleovorans*) を用いて、6-フェノキシヘキサン酸から、3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸と3-ヒドロキシ-6-フェノキシヘキサン酸をユニットとして含むPHAを、8-フェノキシオクタン酸から、3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸、3-ヒドロキシ-6-フェノキシヘキサン酸及び3-ヒドロキシ-8-フェノキシオクタン酸をユニットとして含むPHAを、11-フェノキシウンデカン酸から、3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸と3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸をユニットとして含むPHAを、それぞれ生産することが報告されている。

【0012】

Can. J. Microbiol., 41, 32-43 (1995) には、シュードモナス・オレオボランス (*Pseudomonas oleovorans*) ATCC 29347株及びシュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) KT2422株を用いて、オクタン酸と6-(4-シアノフェノキシ)ヘキサン酸あるいは6-(p-ニトロフェノキシ)ヘキサン酸を基質として、3-ヒドロキシ-6-(4-シアノフェノキシ)ヘキサン酸あるいは3-ヒドロキシ-6-(4-ニトロフェノキシ)ヘキサン酸をモノマーユニットとして含むPHAを生産することが報告されている。

【0013】

また、置換基を側鎖に導入したPHAのうち、フェニルスルファニル基を側鎖に有するPHAの開発としては、Macromolecules., 32, 8315-8318 (1999) には、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) 27N01株を用いて、オクタン酸と11-(フェニルスルファニル)ウンデカン酸を基質として、3-ヒドロキシ-5-(フェニルスルファニル)吉草酸と3-ヒドロキシ-7-(フェニルスルファニル)ヘプタン酸をモノマーユニットとして含むPHAを生産することが報告されている。ただし、その際、シュードモナス・プチダ 27N01株は、予め、炭素源としてオクタン酸のみを含む培地で前培養し、その培養液を炭素源として11-(フェニルスルファニル)ウンデカン酸のみを含む培地にイノキュレートする方法が

用いられている。

【0014】

【発明が解決しようとする課題】

これら側鎖上に官能基を有するPHAのうち、3-ヒドロキシ- ω -（フェニルスルファニル）アルカン酸ユニットを含むPHAに注目すると、そのスルフィド型イオウ（-S-）は反応性が高く、機能性PHAを開発していく際、スルフィド型イオウ（-S-）を有するPHAの種々の誘導体等に関して、今後益々研究がなされていくものと予想される。しかし、この様な、芳香環とスルフィド型イオウ（-S-）とを有するPHAの生合成に関しては、上に挙げた1例の報告があるに過ぎない。更に、上記の3-ヒドロキシ- ω -（フェニルスルファニル）アルカン酸ユニットを含むPHAの生産方法は、目的とするモノマーユニットと比較して、炭素鎖長が長い ω -（フェニルスルファニル）アルカン酸を原料とし、微生物中でその炭素鎖を二炭素ずつ短縮していく β 酸化系を利用し、原料よりも炭素鎖の短い3-ヒドロキシアルカン酸をポリマーのユニットとして取り込ませているため、ポリマー構造の制御が困難であるという課題を有している。

【0015】

この課題を解決するために、本発明者らは、原料とする ω -（フェニルスルファニル）アルカン酸の炭素鎖長を保持する3-ヒドロキシ- ω -（フェニルスルファニル）アルカン酸ユニットを主に含むPHAの生産方法を既に開発し、いずれも未公開であるが、特願2001-57145号ならびに特願2001-57142号として、特許出願がなされている。この二つの出願には、側鎖にスルフィド（-S-）構造を有するユニットを含む新規なポリヒドロキシアルカノエートと、その効率的な製造方法が開示されている。具体的には、微生物を利用して、原料と対応する炭素鎖を有し、その側鎖末端に、フェニルスルファニル基、あるいは、置換フェニルスルファニル基を有するユニット構造を主な成分とするPHA分子が得られ、いずれも、分子中に反応性の高いスルフィド型イオウ（-S-）がそのまま存在している。これら反応性の高いスルフィド型イオウ（-S-）を含む構造から、その反応性を利用して、物理化学的性状の異なる、有用なPHAへと変換する手段の提案、ならびに、かかる手段を用いて作製される新規な

P H A の提案が待たれるものである。これらに加えて、側鎖にスルフィド（- S -）構造を有するユニットを含む新規なポリヒドロキシアルカノエートと、その効率的な製造方法の更なる提案が望まれる。

【 0 0 1 6 】

本発明は前記の課題を解決するもので、本発明の目的は、側鎖にスルフィド（- S -）構造を有するユニットを含む新規なポリヒドロキシアルカノエートと、その効率的な製造方法を提供することにある。より具体的には、本発明の目的は、先に提案した置換フェニルスルファニル基を有するユニット構造を主な成分とする P H A 分子とは異なる、環上の置換基を置換フェニルスルファニル基を有するユニット構造を主な成分とする新規な P H A 分子と、その製造方法を提供することにある。

【 0 0 1 7 】

【課題を解決するための手段】

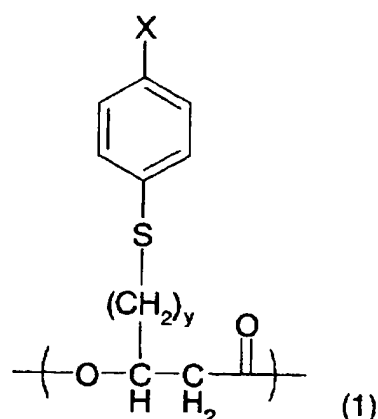
本発明者らは、上記の課題を解決すべく、鋭意研究を進めたところ、 ω -（フェニルスルファニル）アルカン酸から、対応する 3-ヒドロキシ- ω -（フェニルスルファニル）アルカン酸ユニットを含む P H A を産生する能力を有する微生物は、 ω -（置換フェニルスルファニル）アルカン酸から、対応する 3-ヒドロキシ- ω -（置換フェニルスルファニル）アルカン酸ユニットを含む P H A をも生産可能であり、特に、前記置換フェニルスルファニル基として、フェニル基のパラ位に炭素数 4 以下のアルキル基を置換する ω -〔（p-アルキルフェニル）スルファニル〕アルカン酸から、対応する 3-ヒドロキシ- ω -〔（p-アルキルフェニル）スルファニル〕アルカン酸ユニットを含む P H A をも生産可能であることを見出した。加えて、本発明者らは、この 3-ヒドロキシ- ω -〔（p-アルキルフェニル）スルファニル〕アルカン酸ユニットを含む P H A は、従来知られていない新規な P H A であることに気付き、本発明を完成するに至った。

【 0 0 1 8 】

すなわち、本発明のポリヒドロキシアルカノエートは、下記一般式（1）：

【 0 0 1 9 】

【化 1 1】



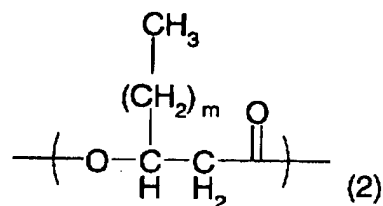
【0 0 2 0】

(式中、Xは、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、tert-ブチル基からなる群から選択されるアルキル基を表し、yは、1～7から選択される任意の整数を表し、ポリマー中において、一つ以上の値をとり得る)で示されるユニットをポリマー分子中に含むことを特徴とするポリヒドロキシアリカノエートである。なお、本発明のPHAでは、前記一般式(1)で示されるユニットに加えて、

下記一般式(2)：

【0 0 2 1】

【化 1 2】

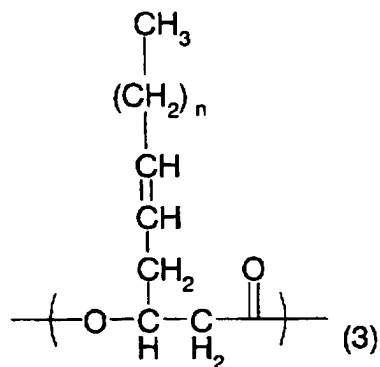


【0 0 2 2】

(式中、mは、0～8から選択される任意の整数を表し、ポリマー中において、一つ以上の値をとり得る)で示される3-ヒドロキシアリカン酸ユニット、あるいは、下記一般式(3)：

【0 0 2 3】

【化 1 3】



【0 0 2 4】

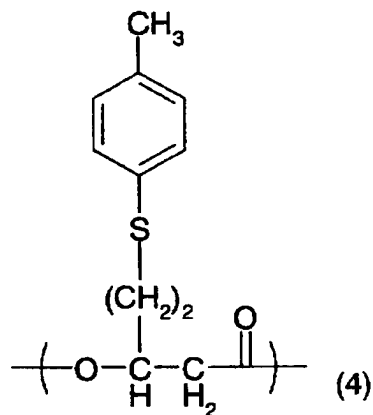
(式中、 n は、3および5から選択される任意の整数を表し、ポリマー中において、一つ以上の値をとり得る)で示される3-ヒドロキシアルカ-5-エン酸ユニットのうち、少なくとも1種類をもポリマー分子中に含むことを特徴とするポリヒドロキシアルカノエートとすることもできる。さらには、そのポリマー分子の数平均分子量は、10000~500000の範囲であることを特徴とするポリヒドロキシアルカノエートとすることができる。

【0 0 2 5】

上記の構成を有する本発明のPHAには、例えば、下記化学式(4)：

【0 0 2 6】

【化 1 4】



【0 0 2 7】

で示される3-ヒドロキシ-5-[(4-メチルフェニル)スルファニル]吉草

酸ユニットを含むことを特徴とするポリヒドロキシアルカノエートが含まれる。

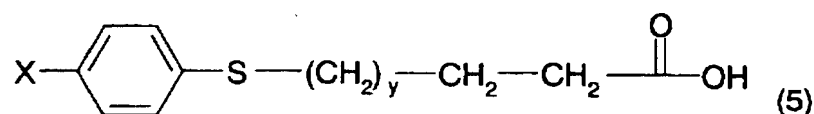
【0028】

また、本発明は、上記の構成を有する本発明のPHAを微生物を利用して生産する方法の発明を併せて提供し、すなわち、本発明のPHAの製造方法は、

(工程1) 下記一般式(5)：

【0029】

【化15】



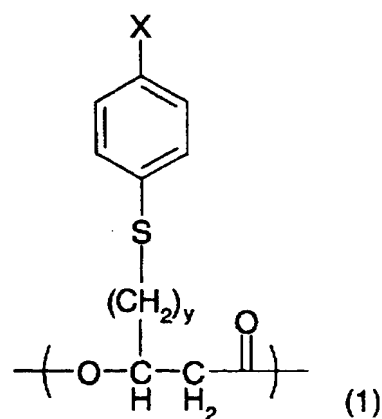
【0030】

(式中、Xは、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、tert-ブチル基からなる群から選択されるアルキル基を表し、yは、1～7から選択される任意の整数を表す)で示される化合物を少なくとも一種以上含む培地中で、ポリヒドロキシアルカノエート産生能を有する微生物を培養する工程と、

(工程2) 培養後、前記微生物の産生する下記一般式(1)：

【0031】

【化16】



【0032】

(式中、Xは、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、tert-ブチル基からなる群から選択されるアルキル基を表し、yは、1～7から選択される任

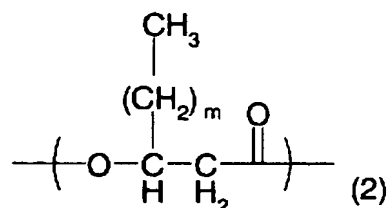
意の整数を表し、ポリマー中において、一つ以上の値をとり得る）で示されるユニットをポリマー分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートを回収する工程とを有することを特徴とするポリヒドロキシアルカノエートの製造方法である。

【0033】

その際、本発明のPHAの製造方法では、前記工程2において回収されるポリヒドロキシアルカノエートは、前記一般式(1)で示されるユニットに加えて、下記一般式(2)：

【0034】

【化17】

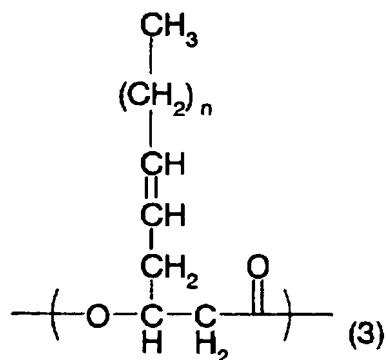


【0035】

(式中、mは、0～8から選択される任意の整数を表し、ポリマー中において、一つ以上の値をとり得る）で示される3-ヒドロキシアルカン酸ユニット、あるいは、下記一般式(3)：

【0036】

【化18】



【0037】

(式中、nは、3および5から選択される任意の整数を表し、ポリマー中におい

て、一つ以上の値をとり得る)で示される3-ヒドロキシアルカー5-エン酸ユニットのうち、少なくとも1種類をもポリマー分子中に含むことを特徴とする製造方法とすることもできる。

【0038】

また、本発明のPHAの製造方法においては、工程1において利用する前記培地は、ポリペプトンを含んでいることができる。あるいは、工程1において利用する前記培地は、酵母エキスを含んでいることができる。さらに、工程1において利用する前記培地は、糖類を含んでいることもできる。この場合、培地中に含有される糖類は、

グリセロアルデヒド、エリトロース、アラビノース、キシロース、グルコース、ガラクトース、マンノース、フルクトース、グリセロール、エリトリール、キシリトリール、グルコン酸、グルクロン酸、ガラクトツロン酸、マルトース、スクロース、ラクトースからなる群から選択される1種類以上の化合物であることが好ましい。

【0039】

加えて、本発明のPHAの製造方法においては、工程1において利用する前記培地は、有機酸またはその塩を含んでいるものでもよい。その際、培地中に含有される有機酸またはその塩は、

ピルビン酸、リンゴ酸、乳酸、クエン酸、コハク酸、あるいはこれらの塩からなる群から選択される1つ以上の化合物であることが好ましい。あるいは、工程1において利用する前記培地は、アミノ酸またはその塩を含んでいることもできる。例えば、培地中に含有されるアミノ酸またはその塩は、

グルタミン酸、アスパラギン酸あるいはこれらの塩からなる群から選択される1つ以上の化合物であることが好ましい。

【0040】

場合によっては、本発明のPHAの製造方法においては、工程1において利用する前記培地は、炭素数4から12の直鎖アルカン酸またはその塩を含んでいることもできる。

【0041】

また、本発明の P H A の製造方法においては、前記工程 1 における微生物の培養は、

(工程 1 - 1) 前記一般式 (5) で示される化合物を少なくとも一種類以上含み、かつポリペプトンを含む培地中で、ポリヒドロキシアルカノエート産生能を有する微生物を培養する工程と、これに続き、

(工程 1 - 2) 前記一般式 (5) で示される化合物を少なくとも一種類以上含み、かつ有機酸またはその塩を含む培地中で、工程 1 - 1 で培養された微生物を更に培養する工程とを有する、少なくとも二段階以上の培養で行うことを特徴とする製造方法とすることもできる。その際、前記工程 1 - 2 で用いる培地中に含有される有機酸またはその塩は、ピルビン酸、リンゴ酸、乳酸、クエン酸、コハク酸あるいはこれらの塩からなる群から選択される 1 つ以上の化合物であることがより好ましい。なお、工程 1 - 2 で利用する培地中に窒素源が含まれていないことがより好ましい。

【 0 0 4 2 】

さらに、本発明の P H A の製造方法においては、前記工程 1 における微生物の培養は、

(工程 1 - 3) 前記一般式 (5) で示される化合物を少なくとも一種類以上含み、かつ糖類を含む培地中で、ポリヒドロキシアルカノエート産生能を有する微生物を培養する工程と、これに続き、

(工程 1 - 4) 前記一般式 (5) で示される化合物を少なくとも一種類以上含み、また、糖類を含む培地中で、工程 1 - 3 で培養された微生物を更に培養する工程とを有する、少なくとも二段階以上の培養で行うことを特徴とする製造方法とすることもできる。その際、前記工程 1 - 3 及び 1 - 4 で用いる培地中に含有される糖類は、グリセロアルデヒド、エリトロース、アラビノース、キシロース、グルコース、ガラクトース、マンノース、フルクトース、グリセロール、エリトリトール、キシリトール、グルコン酸、グルクロン酸、ガラクツロン酸、マルトース、スクロース、ラクトースからなる群から選択される 1 種類以上の化合物であることが好ましい。また、工程 1 - 4 で利用する培地中に窒素源が含まれていないことがより好ましい。

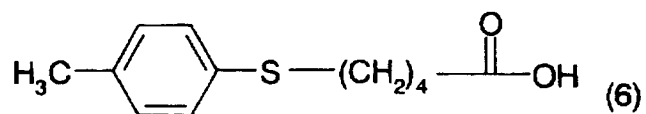
【 0 0 4 3 】

本発明の P H A の製造方法には、例えば、工程 1 において、下記化学式 (6)

:

【 0 0 4 4 】

【 化 1 9 】



【 0 0 4 5 】

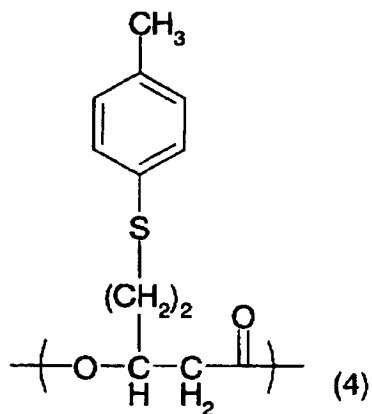
で示される 5 - [(4 - メチルフェニル) スルファニル] 吉草酸を含む培地中で微生物を培養し、

工程 2 において回収するポリヒドロキシアルカノエートは、下記化学式 (4)

:

【 0 0 4 6 】

【 化 2 0 】



【 0 0 4 7 】

で示される 3 - ヒドロキシ - 5 - [(4 - メチルフェニル) スルファニル] 吉草酸ユニットをポリマー分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートであることを特徴とするポリヒドロキシアルカノエートの製造方法が含まれる。

【 0 0 4 8 】

なお、本発明の P H A の製造方法においては、工程 2 のポリヒドロキシアルカ

ノエート回収工程は、工程 1 において培養された微生物細胞中に蓄積されるポリヒドロキシアлкаノエートを抽出する工程を含むことを特徴とする製造方法、もしくは、工程 1 において培養された微生物細胞中に蓄積されるポリヒドロキシアлкаノエートを分離する工程において、微生物細胞を破碎する工程を含むことを特徴とする製造方法とすることが望ましい。

【0049】

一方、上述した種々の構成をとることが可能な本発明の PHA の製造方法において、工程 1 に利用する微生物は、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属に属する微生物であることが好ましい。例えば、前記シュードモナス (*Pseudomonas*) 属に属する微生物が、シュードモナス・チコリアイ YN2 株 (*Pseudomonas cichorii* YN2; FERM BP-7375)、シュードモナス・チコリアイ H45 株 (*Pseudomonas cichorii* H45; FERM BP-7374)、シュードモナス・ジェッセニイ P161 株 (*Pseudomonas jessenii* P161; FERM BP-7376) のうちから選択される微生物であることがより好ましい。

【0050】

【発明の実施の形態】

本発明の新規なポリヒドロキシアлкаノエートは、含まれるヒドロキシアлкаノ酸のモノマーユニット中に、スルフィド構造 ($-S-$) 及び芳香環として、パラ位にアルキル基が置換するフェニル基をその側鎖に有し、この構造によりこれまで知られている微生物生産ポリヒドロキシアлкаノエートとは著しく異なった物理化学的性質を有している。本発明の新規なポリヒドロキシアлкаノエートは、例えば、PHA 生産能力を有する微生物を、原料となる ω -[(*p*-アルキルフェニル)スルファニル]アルカン酸に加えて、増殖用基質を含んだ培地中で培養する工程、この培養工程において微生物により生産され、その細胞内に蓄積される、側鎖末端に(*p*-アルキルフェニル)スルファニル基を有するユニットを含むポリヒドロキシアлкаノエートを回収する工程、この二段階の工程を経て製造されるものである。なお、本発明の PHA は、側鎖末端に置換フェニルスルファニル基を有するユニットを含むので、そのスルファニル基 ($-S-$) が示す

反応性を利用して、化学的修飾を加えた P H A に変換する際、その中間原料としても、有用なものとなる。また、かかる微生物により産生される P H A は、一般式 (1) に示されるユニットを含め、全ての 3 - ヒドロキシアリカン酸ユニットの 3 位の炭素は不斉炭素であるが、その絶対配置は、R 体となり、生分解性を示すものである。

【 0 0 5 1 】

以下に、本発明について、より詳細に説明する。

【 0 0 5 2 】

本発明の P H A の製造方法では、目的とする一般式 (1) で示されるユニットを含む P H A の生産に用いる微生物は、原料化合物の一般式 (5) で示される ω - [(p - アルキルフェニル) スルファニル] アリカン酸を含む培地中で培養した際、対応する側鎖末端に (p - アルキルフェニル) スルファニル基を有する 3 - ヒドロキシアリカン酸ユニットを含む P H A を生産し、その細胞内に蓄積する微生物であれば、いかなる微生物であってもよい。例えば、P H A 産生能を有するシュードモナス (*Pseudomonas*) 属に属する微生物が挙げられる。好適なシュードモナス (*Pseudomonas*) 属に属する微生物の一例を挙げると、シュードモナス・チコリアイ Y N 2 株 (*Pseudomonas cichorii* Y N 2 ; F E R M B P - 7 3 7 5) 、シュードモナス・チコリアイ H 4 5 株 (*Pseudomonas cichorii* H 4 5 , F E R M B P - 7 3 7 4) 、シュードモナス・ジェッセニイ P 1 6 1 株 (*Pseudomonas jessenii* P 1 6 1 , F E R M B P - 7 3 7 6) の三種の菌株が挙げられる。これら三種の微生物は、寄託者として本願出願人を名義として、先に国内寄託され、その後、その原寄託よりブタペスト条約に基づく寄託へと移管され、国際寄託機関としての経済産業省 産業技術総合研究所 生命工学工業技術研究所 (N I B H) よりそれぞれ、前記の受託番号を付与され、現在の、独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託されている。また、新規な P H A 産生能を有する菌株として、既に、特願平 1 1 - 3 7 1 8 6 3 号に記載されている微生物である。

【 0 0 5 3 】

以下に、Y N 2 株、H 4 5 株及び P 1 6 1 株について、その菌学的性質を示す

【0054】

＜Y N 2 株の菌学的性質＞

(1) 形態学的性質

細胞の形と大きさ : 桿菌、 $0.8 \mu\text{m} \times 1.5 \sim 2.0 \mu\text{m}$

細胞の多形性 : なし

運動性 : あり

胞子形成 : なし

グラム染色性 : 陰性

コロニー形状 : 円形、全縁なめらか、低凸状、
表層なめらか、光沢、半透明

(2) 生理学的性質

カタラーゼ : 陽性

オキシダーゼ : 陽性

O/F 試験 : 酸化型 (非発酵性)

硝酸塩の還元 : 陰性

インドールの生成 : 陽性

ブドウ糖酸性化 : 陰性

アルギニンジヒドロラーゼ : 陰性

ウレアーゼ : 陰性

エスクリン加水分解 : 陰性

ゼラチン加水分解 : 陰性

 β -ガラクトシダーゼ : 陰性

King's B寒天での蛍光色素産生 : 陽性

4% NaClでの生育 : 陽性 (弱い生育)

ポリ- β -ヒドロキシ酪酸の蓄積 : 陰性 (*)

Tween 80の加水分解 : 陽性

* nutrient agar培養コロニーをズダンブラックで染色することで判定。

(3) 基質資化能

ブドウ糖	: 陽性
L-アラビノース	: 陽性
D-マンノース	: 陰性
D-マンニトール	: 陰性
N-アセチル-D-グルコサミン	: 陰性
マルトース	: 陰性
グルコン酸カリウム	: 陽性
n-カプリン酸	: 陽性
アジピン酸	: 陰性
d1-リンゴ酸	: 陽性
クエン酸ナトリウム	: 陽性
酢酸フェニル	: 陽性

<H45株の菌学的性質>

(1) 形態学的性質

細胞の形と大きさ	: 桿菌、 $0.8\mu\text{m} \times 1.0 \sim 1.2\mu\text{m}$
細胞の多形性	: なし
運動性	: あり
胞子形成	: なし
グラム染色性	: 陰性
コロニー形状	: 円形、全縁なめらか、低凸状、 表層なめらか、光沢、クリーム色

(2) 生理学的性質

カタラーゼ	: 陽性
オキシダーゼ	: 陽性
O/F試験	: 酸化型

硝酸塩の還元	: 陰性
インドールの生成	: 陰性
ブドウ糖酸性化	: 陰性
アルギニンジヒドロラーゼ	: 陰性
ウレアーゼ	: 陰性
エスクリン加水分解	: 陰性
ゼラチン加水分解	: 陰性
β -ガラクトシダーゼ	: 陰性
King's B寒天での蛍光色素産生	: 陽性
4% NaClでの生育	: 陰性
ポリ- β -ヒドロキシ酪酸の蓄積	: 陰性

(3) 基質資化能

ブドウ糖	: 陽性
L-アラビノース	: 陰性
D-マンノース	: 陽性
D-マンニトール	: 陽性
N-アセチル-D-グルコサミン	: 陽性
マルトース	: 陰性
グルコン酸カリウム	: 陽性
n-カプリン酸	: 陽性
アジピン酸	: 陰性
d1-リンゴ酸	: 陽性
クエン酸ナトリウム	: 陽性
酢酸フェニル	: 陽性

<P161株の菌学的性質>

(1) 形態学的性質

細胞の形と大きさ : 球状、 $\phi 0.6 \mu\text{m}$

桿状、 $0.6\mu\text{m} \times 1.5 \sim 2.0\mu\text{m}$

細胞の多形性 : あり (伸長型)
 運動性 : あり
 胞子形成 : なし
 グラム染色性 : 陰性
 コロニー形状 : 円形、全縁なめらか、低凸状、
 表層なめらか、淡黄色

(2) 生理学的性質

カタラーゼ : 陽性
 オキシダーゼ : 陽性
 O/F試験 : 酸化型
 硝酸塩の還元 : 陽性
 インドールの生成 : 陰性
 ブドウ糖酸性化 : 陰性
 アルギニンジヒドロラーゼ : 陽性
 ウレアーゼ : 陰性
 エスクリン加水分解 : 陰性
 ゼラチン加水分解 : 陰性
 β -ガラクトシダーゼ : 陰性
 King's B寒天での蛍光色素産生 : 陽性

(3) 基質資化能

ブドウ糖 : 陽性
 L-アラビノース : 陽性
 D-マンノース : 陽性
 D-マンニトール : 陽性
 N-アセチル-D-グルコサミン : 陽性
 マルトース : 陰性

グルコン酸カリウム	: 陽性
n-カプリン酸	: 陽性
アジピン酸	: 陰性
d l-リンゴ酸	: 陽性
クエン酸ナトリウム	: 陽性
酢酸フェニル	: 陽性

また、シュードモナス属に属する微生物に加えて、アエロモナス属 (*Aeromonas* sp.)、コマモナス属 (*Comamonas* sp.)、バークホルデリア属 (*Burkholderia* sp.) などに属し、例えば、 ω - (フェニルスルファニル) アルカン酸を原料 (基質) として用いて、3-ヒドロキシ- ω - (フェニルスルファニル) アルカン酸ユニットを含む PHA を生産する微生物を用いることも可能である。

(培養工程)

本発明にかかる PHA の製造方法の工程 1 においては、上記する PHA 産生能を有する微生物を利用して、原料の上記一般式 (5) に示される ω - [(p-アルキルフェニル) スルファニル] アルカン酸から、対応する前記一般式 (1) で表される、側鎖末端に (p-アルキルフェニル) スルファニル基を有する 3-ヒドロキシアルカン酸ユニットを含む PHA を生産させ、細胞内に蓄積させる。

【0055】

この工程 1 に利用する微生物の通常の培養、例えば、保存菌株の作製、PHA の生産に必要とされる菌数や活性状態を確保するための増殖などには、用いる微生物の増殖に必要な成分を含有する培地を適宜選択して用いる。例えば、微生物の生育や生存に悪影響を及ぼすものでない限り、一般的な天然培地 (肉汁培地、酵母エキスなど) や、栄養源を添加した合成培地など、いかなる種類の培地をも用いることができる。温度、通気、攪拌などの培養条件は、用いる微生物に応じて適宜選択する。

【0056】

一方、工程 1 において、前記したような P H A 生産微生物を用いて、目的とする一般式 (1) で示される、側鎖末端に (p-アルキルフェニル) スルファニル基を有する 3-ヒドロキシアルカン酸ユニットを含む P H A を製造する際には、培地として、P H A 生産用の原料として、このモノマーユニットに対応する、上記一般式 (5) で示される ω -[(p-アルキルフェニル) スルファニル] アルカン酸に加えて、微生物の増殖用基質を少なくとも含んだ無機培地などを用いることができる。原料の一般式 (5) で示される化合物は、培地あたり 0.01% ~ 1% (w/v) の範囲、より好ましくは、0.02% ~ 0.2% (w/v) の範囲に初期の含有率を選択することが望ましい。原料の一般式 (5) で示される ω -[(p-アルキルフェニル) スルファニル] アルカン酸は、末端にアルキル置換の芳香環を有するなどの構造のため、その水溶性は必ずしも良好ではないが、上記する微生物は、この化合物を基質として利用できる特性を有するので、培養当初、その溶解度を超える部分は、部分的に懸濁された状態であっても、培養を継続する間に微生物が徐々にその細胞内に取り込む結果、部分的に懸濁されていたものが代わって、培地に溶解するので何ら問題とはならない。

【0057】

なお、原料の一般式 (5) で示される化合物は、分散性を高めるため、場合によっては、1-ヘキサデセンや n-ヘキサデカンのような溶媒に溶解、あるいは、微細な懸濁物とした形状で培地中に添加することも可能である。その際には、利用する 1-ヘキサデセンや n-ヘキサデカンのような溶媒の添加濃度は、培地に対して、その濃度は 3% (v/v) 以下にすることが必要である。

【0058】

培地には、微生物が増殖に利用する増殖用基質を別途添加する。この増殖用基質は、酵母エキスやポリペプトンといった栄養素を用いることが可能である。更に、糖類、T C A 回路中の中間体として生じる有機酸ならびに T C A 回路から一段階ないしは二段階の生化学反応を経て生じる有機酸またはその塩、アミノ酸またはその塩、炭素数 4 ~ 12 の直鎖アルカン酸またはその塩などから、用いる菌株に応じて、増殖用基質としての有用性を考慮して、適宜選択することができる。

【 0 0 5 9 】

これら種々の増殖用基質のうち、糖類としては、グリセロアルデヒド、エリトロース、アラビノース、キシロース、グルコース、ガラクトース、マンノース、フルクトースといったアルドース、グリセロール、エリトリトール、キシリトール等のアルジトール、グルコン酸等のアルドン酸、グルクロン酸、ガラクトツロン酸等のウロン酸、マルトース、スクロース、ラクトースといった二糖等から選ばれる1つ以上の化合物が好適に利用できる。

【 0 0 6 0 】

また、有機酸あるいはその塩としては、ピルビン酸、リンゴ酸、乳酸、クエン酸、コハク酸またはそれらの塩からなる群から選ばれる1つ以上の化合物が好適に利用できる。一方、アミノ酸またはその塩としては、グルタミン酸、アスパラギン酸あるいはそれらの塩からなる群から選ばれる1つ以上の化合物が好適に利用できる。

【 0 0 6 1 】

一般に、これら種々の増殖用基質の中でも、ポリペプトンや糖類を用いるのがより好ましい。原料化合物と共存させる、これらの増殖用基質基質は、通常、培地あたり0.1%~5%(w/v)の範囲、より好ましくは、0.2%~2%(w/v)の範囲にその含有率を選択することが望ましい。

【 0 0 6 2 】

微生物にPHAを生産・蓄積させる工程1における、培養方法としては、一旦十分に増殖させた後に、塩化アンモニウムのような窒素源を制限した培地へ菌体に移し、目的ユニットの基質となる化合物を加えた状態でさらに培養すると生産性が向上する場合がある。例えば、前記の異なる培養条件からなる工程を複数段接続した多段方式の採用が挙げられる。

【 0 0 6 3 】

より具体的には、(工程1-1)として、一般式(5)で示される化合物、ならびに増殖用基質となるポリペプトンを含む培地中で微生物を培養する工程を対数増殖後期から定常期の時点まで続け、一旦菌体を遠心分離等で回収した後、これに続き、(工程1-2)として、一般式(5)で示される化合物、ならびに増

殖用基質となる、先の例示したような有機酸またはその塩を含む培地中で、前段の工程 1-1 で培養・増殖した微生物の菌体をさらに培養する工程を行なう二段階培養方法、あるいは、(工程 1-3) として、一般式 (5) で示される化合物、ならびに増殖用基質となる、先の例示したような糖類を含む培地中で微生物を培養する工程を対数増殖後期から定常期の時点まで続け、一旦菌体を遠心分離等で回収した後、これに続き、(工程 1-4) として、一般式 (5) で示される化合物、ならびに増殖用基質となる糖類を含み、窒素源を含まない培地中で、前段の工程 1-3 で培養・増殖した微生物の菌体をさらに培養する工程を行なう二段階培養方法等を利用することが一層好ましい。この二段階培養方法では、前段において、原料の上記一般式 (5) で示される ω -[(p-アルキルフェニル)スルファニル]アルカン酸から、対応する前記一般式 (1) で示される、側鎖末端に置換フェニルスルファニル基を有する 3-ヒドロキシアルカン酸ユニットを含む PHA を生産させつつ、菌体の増殖を予め行い、後段では、窒素源を含まない培地中で、既に培養された菌体に、主に PHA の生産を行わせる培養形態とすることで、細胞内に蓄積される PHA 量をさらに高くすることができる。

【0064】

工程 1 における培養温度は、上記の菌株が良好に増殖可能な温度であればよく、例えば、15~40℃、好ましくは 20~35℃の範囲、より好ましくは 20℃~30℃の範囲に選択するのが適当である。

【0065】

培養は、液体培養、固体培養など、利用する微生物が増殖し、培地中に含有される原料の一般式 (5) の化合物から、前記一般式 (1) で示されるユニットを含む PHA を生産する培養方法ならば、いかなる培養方法をも用いることができる。さらには、原料、増殖用基質、さらには酸素の供給が適正に行われるならば、バッチ培養、フェドバッチ培養、半連続培養、連続培養などの種類も問わない。例えば、液体バッチ培養の形態としては、振とうフラスコによって振とうさせて酸素を供給する方法、ジャーファーマンターによる攪拌通気方式の酸素供給方法がある。

【0066】

上記の培養方法に用いる無機培地としては、リン源（例えば、リン酸塩など）、窒素源（例えば、アンモニウム塩、硝酸塩など）等、微生物の増殖に必要な成分を含んでいる培地であればいかなるものでも良く、例えば、MSB培地、M9培地等を挙げることができる。

【0067】

例えば、後の述べる実施例において用いた無機塩培地：M9培地の組成を以下に示す。

[M9培地]

Na_2HPO_4 6.2 g

KH_2PO_4 3.0 g

NaCl 0.5 g

NH_4Cl 1.0 g

（培地1リットル中、pH7.0）

更に、良好な増殖と、それに伴うPHAの生産のためには、上記の無機塩培地に、例えば、以下に示す微量成分溶液を0.3%（v/v）程度添加して、必須微量元素を補う必要がある。

【0068】

[微量成分溶液]

ニトリロ三酢酸 : 1.5 g ;

MgSO_4 : 3.0 g ;

MnSO_4 : 0.5 g ;

NaCl : 1.0 g ;

FeSO_4 : 0.1 g ;

CaCl_2 : 0.1 g ;

CoCl_2 : 0.1 g ;

ZnSO_4 : 0.1 g ;

CuSO_4 : 0.1 g ;

$\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$: 0.1 g ;

H_3BO_3 : 0.1 g ;

Na_2MoO_4 : 0.1 g ;

NiCl_2 : 0.1 g

(溶液 1 リットル中、pH 7.0)

(PHA の回収工程)

本発明に用いる微生物は、このような培養方法により、上記一般式 (1) で示される、側鎖末端に (p-アルキルフェニル) スルファニル基を有する 3-ヒドロキシアリカン酸ユニットを含む PHA を産生し、その菌体内に蓄積する。従って、本発明の PHA の製造方法では、培養後、その培養菌体から、目的とする PHA を回収する工程を設ける。

【0069】

この菌体からの PHA の回収には、溶媒抽出法を利用して、PHA を細胞由来の不溶成分と分離し、回収する手段を用いることができる。通常行われているクロロホルム抽出が最も簡便であるが、クロロホルム以外に、ジクロロメタン、ジオキサン、テトラヒドロフラン、アセトニトリル、アセトン等が用いられる場合もある。また、有機溶媒が使用しにくい環境中においては、SDS 等の界面活性剤処理、リゾチーム等の酵素処理によって、PHA 以外の菌体内成分を可溶化・除去することによって、不溶性画分として、PHA のみを回収する方法を採ることもできる。

【0070】

本発明の方法により製造される、微生物産生の PHA は、一般式 (1) のユニットに加えて、培地中に添加する増殖用基質を利用して、脂肪酸合成系を介して生合成する、一般式 (2) で示される 3-ヒドロキシアリカン酸ユニット、あるいは、一般式 (3) で示される 3-ヒドロキシアリカ-5-エン酸ユニットを含むこともある。なお、含まれる 3-ヒドロキシアリカン酸ユニットは、いずれも、その 3 位の炭素原子は不斉炭素であるが、その絶対配置は同じく R-体であり、その生分解性を保持することは勿論のことである。一般式 (1) のユニット中の、フェニルスルファニル基部分に、ベンゼン環上のパラ位にアルキル基を有す

ることで、ポリマーそのものの疎水性を更に高めるなど、物性の改良が見込まれ、これまでに応用し得なかった分野への展開が期待できる。

【0071】

【実施例】

以下に、実施例を挙げて、本発明をより具体的に説明する。これら実施例は、本発明の最良の実施形態の一例ではあるものの、本発明は、これら実施例により限定されうるものではない。

【0072】

（実施例1）

D-グルコース0.5%、5-[(4-メチルフェニル)スルファニル]吉草酸（以下、MeTPxVAと略す）0.1%を含むM9培地200mlに、シュードモナス・チコリアイ・YN2株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。72時間後、菌体を遠心分離により回収し、D-グルコース0.5%、MeTPxVA0.1%を含み、窒素源（NH₄Cl）を含まないM9培地200mlに再懸濁して、更に、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。また、凍結乾燥された菌体の重量（菌体乾燥重量）を秤量した。

【0073】

この凍結乾燥菌体ペレットを20mlクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブラン・フィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮した。この濃縮液を、冷メタノール中に加えて、PHAを再沈澱させた。更に、沈澱物のみを回収し、次いで、真空乾燥した後、PHAポリマーの乾燥重量（回収量）を秤量した。本例では、PHA75mg（乾燥重量）が得られた。

【0074】

得られたPHAの平均分子量を、ゲル・パーミエーション・クロマトグラフィー（GPC；東ソーHLC-8220、カラム；東ソーTSK-GEL SuperHM-H、溶媒；クロロホルム、ポリスチレン換算）により評価した。その結果、数平均分子量 $M_n = 60300$ 、質量平均分子量 $M_w = 131600$

であった。

【0075】

また、得られたPHAの構造を特定するため、以下の条件でNMR分析を行った。

測定装置：B r u k e r D P X 4 0 0 F T - N M R

^1H 共鳴周波数：400MHz

測定核種： ^1H

使用溶媒： CDCl_3

reference：キャピラリ封入TMS/ CDCl_3

測定温度：室温

図1に、測定された ^1H -NMRスペクトルチャートを示し、また、表1に、その同定結果を示す。

【0076】

【表1】

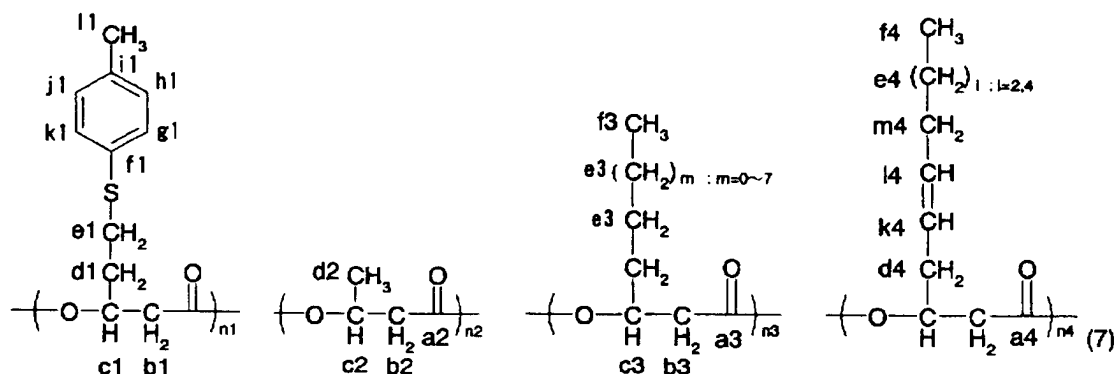
Chemical shift (ppm)	積分比	分裂	同定結果
1.88	2 H	m	d
2.28	3 H	s	l
2.43~2.63	2 H	m	b
2.82	2 H	m	e
5.24	1 H	m	c
7.05	2 H	m	g,k
7.20	2 H	m	h,j

【0077】

この表1に示すように、このPHAは、3-ヒドロキシ-5-[(4-メチルフェニル)スルファニル]吉草酸（以下、3HMeTPxVと略す）をモノマーユニットとして含んでおり、また、それ以外のモノマーユニットとして、3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4~12までの直鎖3-ヒドロキシアルカン酸ユニットあるいは、直鎖の3-ヒドロキシアルケン酸ユニットを含んでおり、具体的には、その組成は、下記化学式（7）：

【0078】

【化 2 1】



【 0 0 7 9 】

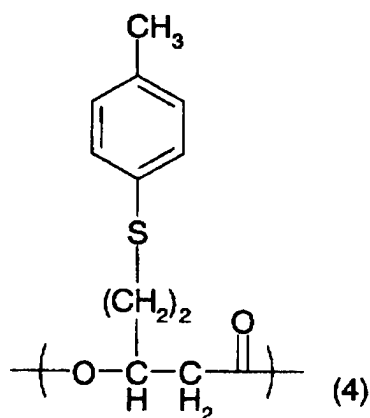
で表されるミックスポリマー P H A であることが確認された。

【 0 0 8 0 】

更に、含有されるユニットの含有比率（組成比）を調べるため、得られた P H A は、常法に従ってメタノリシスを行った後、ガスクロマトグラフィー質量分析装置（G C - M S、島津 Q P - 5 0 5 0、E I 法）で分析し、P H A モノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。図 2 に、測定された、G C - M S スペクトルデータを示し、また、表 2 に、前記ガスクロマトグラフィーのピークエリアに基づき算出した、含有される各ユニットの含有比率（組成比）を示す。この図 2 に示す結果からも、当該 P H A は下記化学式（4）：

【 0 0 8 1 】

【化 2 2】



【 0 0 8 2 】

で表される 3 HMeTPxV のユニットを含む PHA であることが確認された。

【0083】

【表 2】

菌体乾燥重量	1065mg/L
ポリマー乾燥重量	375mg/L
ポリマー乾燥重量／菌体乾燥重量	35.2%
モノマーユニット組成（ピークエリア比）	
3-ヒドロキシ酪酸	6.7%
3-ヒドロキシヘキサン酸	1.4%
3-ヒドロキシオクタン酸	12.7%
3-ヒドロキシデカン酸	24.7%
3-ヒドロキシドデカン酸	7.0%
3-ヒドロキシドデセン酸	8.0%
3-ヒドロキシ-5-〔（4-メチルフェニル）スルファニル〕吉草酸	39.5%

【0084】

（実施例 2）

D-グルコース 0.5%、MeTPxVA 0.1% を含む M9 培地 200 ml に、シュドモナス・チコリアイ・H45 株を植菌し、30℃、125 ストローク／分で振盪培養した。72 時間後、菌体を遠心分離により回収し、D-グルコース 0.5%、MeTPxVA 0.1% を含み、窒素源（ NH_4Cl ）を含まない M9 培地 200 ml に再懸濁して、更に、30℃、125 ストローク／分で振盪培養した。48 時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。また、凍結乾燥された菌体の重量（菌体乾燥重量）を秤量した。

【0085】

この凍結乾燥菌体ペレットを 20 ml クロロホルムに懸濁し、60℃で 20 時間攪拌して PHA を抽出した。抽出液を孔径 0.45 μm のメンブラン・フィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮した。この濃縮液を、冷メタノール中に加えて、PHA を再沈澱させた。更に、沈澱物のみを回収し、次いで、真空乾燥した後、PHA ポリマーの乾燥重量（回収量）を秤量した。本例では、PHA 71 mg（乾燥重量）が得られた。

【 0 0 8 6 】

得られた P H A について、含有されるユニットの含有比率（組成比）を調べるため、実施例 1 と同様の条件でメタノリシスを行った後、ガスクロマトグラフィー質量分析装置で分析し、P H A モノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。表 3 に、測定結果に基づき算出した、含有される各ユニットの含有比率（組成比）を示す。その結果、当該 P H A も、上記化学式（4）で表される 3 H M e T P x V のユニットを含む P H A であることが確認された。

【 0 0 8 7 】

【表 3】

菌体乾燥重量	835mg/L
ポリマー乾燥重量	355mg/L
ポリマー乾燥重量／菌体乾燥重量	42.5%
モノマーユニット組成（ピークエリア比）	
3-ヒドロキシ酪酸	0.0%
3-ヒドロキシヘキサン酸	1.4%
3-ヒドロキシオクタン酸	9.2%
3-ヒドロキシデカン酸	20.8%
3-ヒドロキシドデカン酸	4.2%
3-ヒドロキシドデセン酸	7.1%
3-ヒドロキシ-5-〔（4-メチルフェニル）スルファニル〕吉草酸	57.3%

【 0 0 8 8 】

（実施例 3）

D-グルコース 0.5%、MeTPxVA 0.1% を含む M9 培地 200 ml に、シュードモナス・ジェッセニイ・P161 株を植菌し、30℃、125 ストローク／分で振盪培養した。72 時間後、菌体を遠心分離により回収し、D-グルコース 0.5%、MeTPxVA 0.1% を含み、窒素源（NH₄Cl）を含まない M9 培地 200 ml に再懸濁して、更に、30℃、125 ストローク／分で振盪培養した。48 時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。また、凍結乾燥された菌体の重量（菌体乾燥重量）を秤量した。

【 0 0 8 9 】

この凍結乾燥菌体ペレットを20mlクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブラン・フィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮した。この濃縮液を、冷メタノール中に加えて、PHAを再沈澱させた。更に、沈澱物のみを回収し、次いで、真空乾燥した後、PHAポリマーの乾燥重量（回収量）を秤量した。本例では、PHA52mg（乾燥重量）が得られた。

【0090】

得られたPHAについて、含有されるユニットの含有比率（組成比）を調べるため、実施例1と同様の条件でメタノリシスを行った後、ガスクロマトグラフィー質量分析装置で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。表4に、測定結果に基づき算出した、含有される各ユニットの含有比率（組成比）を示す。その結果、当該PHAも、上記化学式（4）で表される3HMeTPxVのユニットを含むPHAであることが確認された。

【0091】

【表4】

菌体乾燥重量	965mg/L
ポリマー乾燥重量	260mg/L
ポリマー乾燥重量／菌体乾燥重量	26.9%
モノマーユニット組成（ピークエリア比）	
3-ヒドロキシ酪酸	6.3%
3-ヒドロキシヘキサン酸	1.8%
3-ヒドロキシオクタン酸	14.0%
3-ヒドロキシデカン酸	22.8%
3-ヒドロキシドデカン酸	6.7%
3-ヒドロキシドデセン酸	11.6%
3-ヒドロキシ-5- [(4-メチルフェニル) スルファニル] 吉草酸	36.8%

【0092】

（実施例4）

ポリペプトン（販売元 和光純薬工業）0.5%、MeTPxVA0.1%を含むM9培地200mlに、シュードモナス・チコリアイ・YN2株を植菌し、30℃、125ストローク／分で振盪培養した。72時間後、菌体を遠心分離に

より回収し、ピルビン酸ナトリウム 0.5%、MeTPxVA 0.1%を含み、窒素源 (NH_4Cl) を含まない M9 培地 200 ml に再懸濁して、更に、30℃、125 ストローク/分で振盪培養した。48 時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。また、凍結乾燥された菌体の重量 (菌体乾燥重量) を秤量した。

【0093】

この凍結乾燥菌体ペレットを 20 ml クロロホルムに懸濁し、60℃で 20 時間攪拌して PHA を抽出した。抽出液を孔径 0.45 μm のメンブラン・フィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮した。この濃縮液を、冷メタノール中に加えて、PHA を再沈澱させた。更に、沈澱物のみを回収し、次いで、真空乾燥した後、PHA ポリマーの乾燥重量 (回収量) を秤量した。本例では、PHA 120 mg (乾燥重量) が得られた。

【0094】

得られた PHA について、含有されるユニットの含有比率 (組成比) を調べるため、実施例 1 と同様の条件でメタノリシスを行った後、ガスクロマトグラフィー質量分析装置で分析し、PHA モノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。表 5 に、測定結果に基づき算出した、含有される各ユニットの含有比率 (組成比) を示す。その結果、当該 PHA も、上記化学式 (4) で表される 3HMeTPxV のユニットを含む PHA であることが確認された。

【0095】

【表 5】

菌体乾燥重量	950mg/L
ポリマー乾燥重量	600mg/L
ポリマー乾燥重量/菌体乾燥重量	63.2%
モノマーユニット組成 (ピークエリア比)	
3-ヒドロキシ酪酸	8.7%
3-ヒドロキシヘキサン酸	2.1%
3-ヒドロキシオクタン酸	10.9%
3-ヒドロキシデカン酸	23.2%
3-ヒドロキシドデカン酸	6.4%
3-ヒドロキシドデセン酸	12.7%
3-ヒドロキシ-5- [(4-メチルフェニル) チオ] 吉草酸	36.0%

【0096】

(実施例5)

ポリペプトン（販売元 和光純薬工業）0.5%、MeTPxVA 0.1%を含むM9培地200mlに、シュードモナス・チコリアイ・H45株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。72時間後、菌体を遠心分離により回収し、ピルビン酸ナトリウム0.5%、MeTPxVA 0.1%を含み、窒素源（ NH_4Cl ）を含まないM9培地200mlに再懸濁して、更に、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。また、凍結乾燥された菌体の重量（菌体乾燥重量）を秤量した。

【0097】

この凍結乾燥菌体ペレットを20mlクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45 μm のメンブラン・フィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮した。この濃縮液を、冷メタノール中に加えて、PHAを再沈澱させた。更に、沈澱物のみを回収し、次いで、真空乾燥した後、PHAポリマーの乾燥重量（回収量）を秤量した。本例では、PHA 57mg（乾燥重量）が得られた。

【0098】

得られたPHAについて、含有されるユニットの含有比率（組成比）を調べるため、実施例1と同様の条件でメタノリシスを行った後、ガスクロマトグラフィー質量分析装置で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。表6に、測定結果に基づき算出した、含有される各ユニットの含有比率（組成比）を示す。その結果、当該PHAも、上記化学式（4）で表される3HMeTPxVのユニットを含むPHAであることが確認された。

【0099】

【表 6】

菌体乾燥重量	880mg/L
ポリマー乾燥重量	285mg/L
ポリマー乾燥重量／菌体乾燥重量	32.4%
モノマーユニット組成（ピークエリア比）	
3-ヒドロキシ酪酸	0.5%
3-ヒドロキシヘキサン酸	1.4%
3-ヒドロキシオクタン酸	8.8%
3-ヒドロキシデカン酸	17.6%
3-ヒドロキシドデカン酸	4.1%
3-ヒドロキシドデセン酸	6.5%
3-ヒドロキシ-5- [(4-メチルフェニル) スルファニル] 吉草酸	61.1%

【0100】

（実施例 6）

ポリペプトン（販売元 和光純薬工業）0.5%、MeTPxVAO.1%を含むM9培地200mlに、シュードモナス・ジェッセニイ・P161株を植菌し、30℃、125ストローク／分で振盪培養した。72時間後、菌体を遠心分離により回収し、ピルビン酸ナトリウム0.5%、MeTPxVAO.1%を含み、窒素源（ NH_4Cl ）を含まないM9培地200mlに再懸濁して、更に、30℃、125ストローク／分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。また、凍結乾燥された菌体の重量（菌体乾燥重量）を秤量した。

【0101】

この凍結乾燥菌体ペレットを20mlクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45 μm のメンブラン・フィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮した。この濃縮液を、冷メタノール中に加えて、PHAを再沈澱させた。更に、沈澱物のみを回収し、次いで、真空乾燥した後、PHAポリマーの乾燥重量（回収量）を秤量した。本例では、PHA56mg（乾燥重量）が得られた。

【0102】

得られたPHAについて、含有されるユニットの含有比率（組成比）を調べる

ため、実施例1と同様の条件でメタノリシスを行った後、ガスクロマトグラフィー質量分析装置で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。表7に、測定結果に基づき算出した、含有される各ユニットの含有比率（組成比）を示す。その結果、当該PHAも、上記化学式（4）で表される3HMeTPxVのユニットを含むPHAであることが確認された。

【0103】

【表7】

菌体乾燥重量	785mg/L
ポリマー乾燥重量	280mg/L
ポリマー乾燥重量／菌体乾燥重量	35.7%
モノマーユニット組成（ピークエリア比）	
3-ヒドロキシ酪酸	8.8%
3-ヒドロキシヘキサン酸	2.1%
3-ヒドロキシオクタン酸	13.4%
3-ヒドロキシデカン酸	25.7%
3-ヒドロキシドデカン酸	6.0%
3-ヒドロキシドデセン酸	7.7%
3-ヒドロキシ-5-〔（4-メチルフェニル）スルファニル〕吉草酸	36.3%

【0104】

（実施例7）

ポリペプトン（販売元 和光純薬工業）0.5%、MeTPxVA0.1%を含むM9培地200mlに、シュードモナス・チコリアイ・YN2株を植菌し、30℃、125ストローク／分で振盪培養した。61時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。また、凍結乾燥された菌体の重量（菌体乾燥重量）を秤量した。

【0105】

この凍結乾燥菌体ペレットを20mlクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブラン・フィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮した。この濃縮液を、冷メタノール中に加えて、PHAを再沈澱させた。更に、沈澱物のみを回収し、次いで、真空乾燥した後、PHAポリマーの乾燥重量（回収量）を秤量した。本例で

は、PHA 5 mg (乾燥重量) が得られた。

【0106】

得られたPHAについて、含有されるユニットの含有比率(組成比)を調べるため、実施例1と同様の条件でメタノリシスを行った後、ガスクロマトグラフィー質量分析装置で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。表8に、測定結果に基づき算出した、含有される各ユニットの含有比率(組成比)を示す。その結果、当該PHAも、上記化学式(4)で表される3HMeTPxVのユニットを含むPHAであることが確認された。

【0107】

【表8】

菌体乾燥重量	590mg/L
ポリマー乾燥重量	25mg/L
ポリマー乾燥重量/菌体乾燥重量	4.2%
モノマーユニット組成(ピークエリア比)	
3-ヒドロキシ酪酸	25.1%
3-ヒドロキシヘキサン酸	1.0%
3-ヒドロキシオクタン酸	8.6%
3-ヒドロキシデカン酸	9.5%
3-ヒドロキシドデカン酸	2.9%
3-ヒドロキシドデセン酸	1.1%
3-ヒドロキシ-5-[(4-メチルフェニル)スルファニル]吉草酸	51.8%

【0108】

(実施例8)

酵母エキス(DIFCO製)0.5%、MeTPxVA0.1%を含むM9培地200mlに、シュードモナス・チコリアイ・YN2株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。61時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。また、凍結乾燥された菌体の重量(菌体乾燥重量)を秤量した。

【0109】

この凍結乾燥菌体ペレットを20mlクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブラン・フィル

ターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮した。この濃縮液を、冷メタノール中に加えて、PHAを再沈澱させた。更に、沈澱物のみを回収し、次いで、真空乾燥した後、PHAポリマーの乾燥重量（回収量）を秤量した。本例では、PHA 2 mg（乾燥重量）が得られた。

【0110】

得られたPHAについて、含有されるユニットの含有比率（組成比）を調べるため、実施例1と同様の条件でメタノリシスを行った後、ガスクロマトグラフィー質量分析装置で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。表9に、測定結果に基づき算出した、含有される各ユニットの含有比率（組成比）を示す。その結果、当該PHAも、上記化学式（4）で表される3HMeTPxVのユニットを含むPHAであることが確認された。

【0111】

【表9】

菌体乾燥重量	840mg/L
ポリマー乾燥重量	10mg/L
ポリマー乾燥重量／菌体乾燥重量	1.2%
モノマーユニット組成（ピークエリア比）	
3-ヒドロキシ酪酸	20.5%
3-ヒドロキシヘキサン酸	1.1%
3-ヒドロキシオクタン酸	12.4%
3-ヒドロキシデカン酸	17.1%
3-ヒドロキシドデカン酸	4.0%
3-ヒドロキシドデセン酸	2.1%
3-ヒドロキシ-5-[(4-メチルフェニル)スルファニル]吉草酸	42.9%

【0112】

（実施例9）

グルタミン酸0.5%、MeTPxVA0.1%を含むM9培地200mlに、シュードモナス・チコリアイ・YN2株を植菌し、30℃、125ストローク／分で振盪培養した。61時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。また、凍結乾燥された菌体の重量（菌体乾燥重量）を秤量した。

【0113】

この凍結乾燥菌体ペレットを20mlクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブラン・フィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮した。この濃縮液を、冷メタノール中に加えて、PHAを再沈澱させた。更に、沈澱物のみを回収し、次いで、真空乾燥した後、PHAポリマーの乾燥重量（回収量）を秤量した。本例では、PHA 3mg（乾燥重量）が得られた。

【0114】

得られたPHAについて、含有されるユニットの含有比率（組成比）を調べるため、実施例1と同様の条件でメタノリシスを行った後、ガスクロマトグラフィー質量分析装置で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。表10に、測定結果に基づき算出した、含有される各ユニットの含有比率（組成比）を示す。その結果、当該PHAも、上記化学式（4）で表される3HMeTPxVのユニットを含むPHAであることが確認された。

【0115】

【表10】

菌体乾燥重量	585mg/L
ポリマー乾燥重量	15mg/L
ポリマー乾燥重量／菌体乾燥重量	2.6%
モノマーユニット組成（ピークエリア比）	
3-ヒドロキシ酪酸	32.3%
3-ヒドロキシヘキサン酸	1.6%
3-ヒドロキシオクタン酸	17.6%
3-ヒドロキシデカン酸	18.6%
3-ヒドロキシドデカン酸	5.2%
3-ヒドロキシドデセン酸	5.9%
3-ヒドロキシ-5-[(4-メチルフェニル)スルファニル]吉草酸	18.8%

【0116】

（実施例10）

ノナン酸0.1%、MeTPxVA0.1%を含むM9培地200mlに、シユードモナス・チコリアイ・YN2株を植菌し、30℃、125ストローク／分

で振盪培養した。61時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。また、凍結乾燥された菌体の重量（菌体乾燥重量）を秤量した。

【0117】

この凍結乾燥菌体ペレットを20mlクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブラン・フィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮した。この濃縮液を、冷メタノール中に加えて、PHAを再沈澱させた。更に、沈澱物のみを回収し、次いで、真空乾燥した後、PHAポリマーの乾燥重量（回収量）を秤量した。本例では、PHA31mg（乾燥重量）が得られた。

【0118】

得られたPHAについて、含有されるユニットの含有比率（組成比）を調べるため、実施例1と同様の条件でメタノリシスを行った後、ガスクロマトグラフィー質量分析装置で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。表11に、測定結果に基づき算出した、含有される各ユニットの含有比率（組成比）を示す。その結果、当該PHAも、上記化学式（4）で表される3HMeTPxVのユニットを含むPHAであることが確認された。

【0119】

【表11】

菌体乾燥重量	460mg/L
ポリマー乾燥重量	155mg/L
ポリマー乾燥重量／菌体乾燥重量	33.7%
モノマーユニット組成（ピークエリア比）	
3-ヒドロキシ吉草酸	1.4%
3-ヒドロキシヘプタン酸	32.6%
3-ヒドロキシオクタン酸	3.5%
3-ヒドロキシノナン酸	60.8%
3-ヒドロキシデカン酸	0.7%
3-ヒドロキシ-5-〔（4-メチルフェニル）スルファニル〕吉草酸	1.0%

【0120】

【発明の効果】

本発明の P H A の製造方法においては、原料として、 ω -[(p-アルキルフェニル)スルファニル]アルカン酸含む培地中で微生物を培養し、対応する 3-ヒドロキシ- ω -[(p-アルキルフェニル)スルファニル]アルカン酸ユニットを含む新規な生分解性 P H A が効率的に製造される。また、本発明の P H A は、かかる 3-ヒドロキシ- ω -[(p-アルキルフェニル)スルファニル]アルカン酸ユニットを含むので、ベンゼン環に加えて、その環上にアルキル基が置換し、より高い疎水性を有する部分構造を利用する、機能性ポリマーとして有用なポリヒドロキシアルカノエートであり、デバイス材料や医薬材料等の各分野への応用が期待できる。さらには、この側鎖に存在するスルファニル基(-S-)は、その反応性を利用して、化学的な修飾により他のイオウを含む基に変換でき、新たな機能を付加する上で、その中間原料としても利用できる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

実施例 1 において得られた P H A の ^1H -NMR スペクトルを示す。

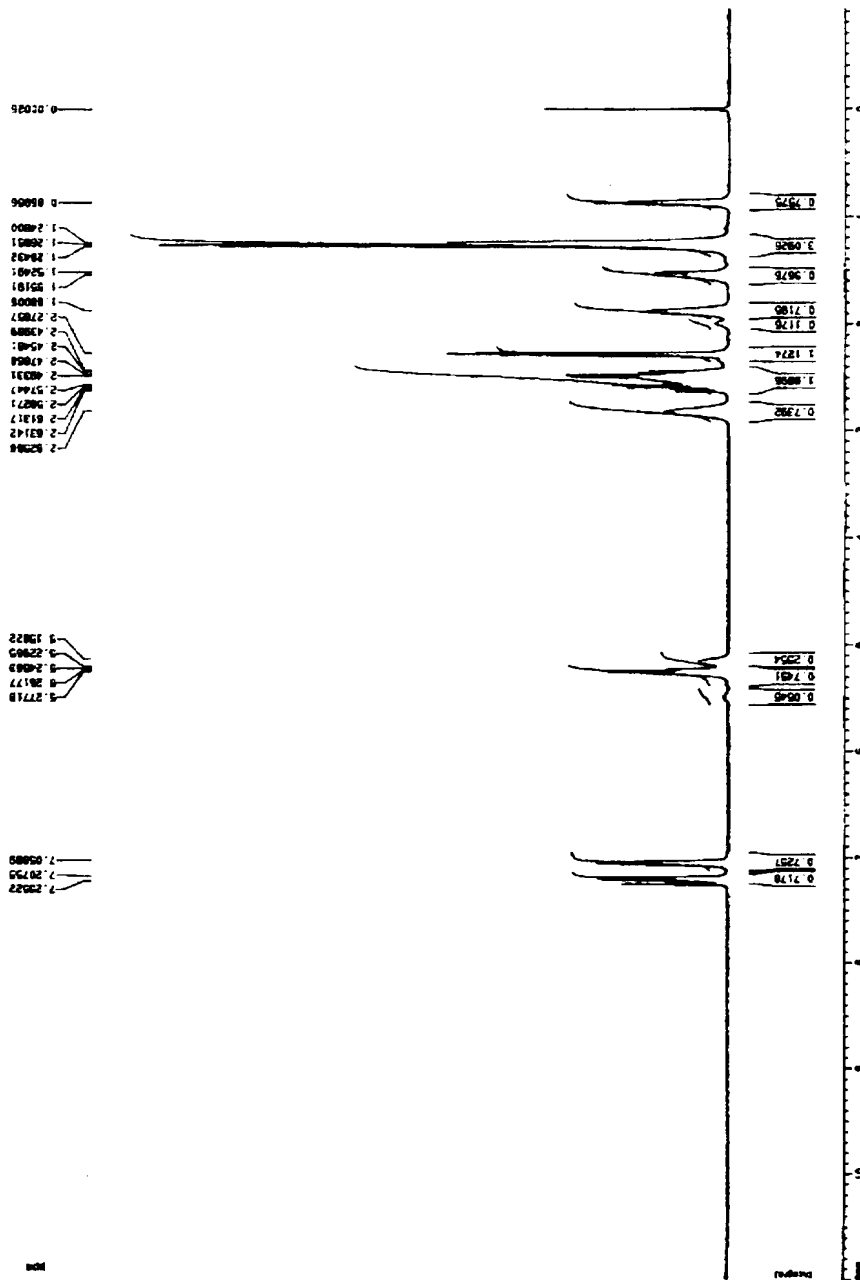
【図 2】

実施例 1 の P H A から、メタノリシスにより得られるモノマーメチルエステル体混合物の G C - M S 測定結果であり、上に、混合物の T I C (ガスクロマトグラフィー)、下に、3 H M e T P x V のメチルエステル体の M S スペクトルをそれぞれ示す。

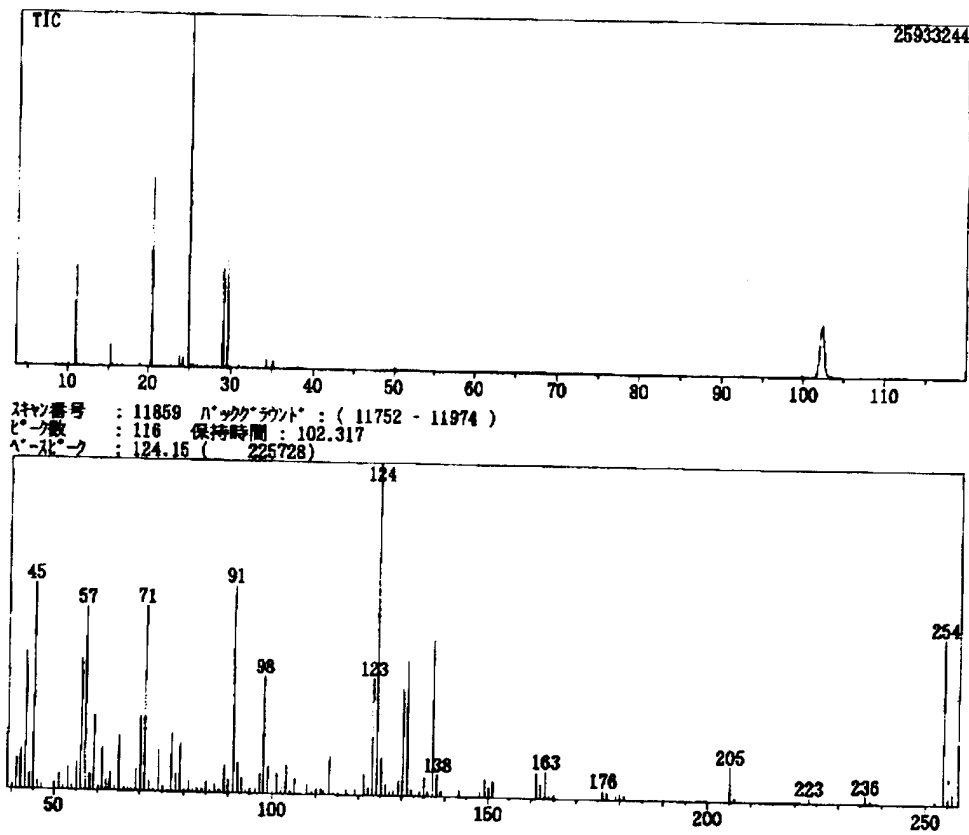
【書類名】

図面

【図 1】



【図2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 側鎖にスルフィド（-S-）構造を有するユニットを含む新規なポリヒドロキシアлкаノエートと、その効率的な製造方法の提供。

【解決手段】 原料として、 ω -[(p-アルキルフェニル)スルファニル]アルカン酸を含む培地中でポリヒドロキシアлкаノエート産生能を有する微生物を培養し、その培養菌体中に蓄積される3-ヒドロキシ- ω -[(p-アルキルフェニル)スルファニル]アルカン酸ユニットを含むポリヒドロキシアлкаノエートを溶媒抽出などで回収して、目的とする新規なポリヒドロキシアлкаノエートを製造する。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001007]

1. 変更年月日 1990年 8月30日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都大田区下丸子3丁目30番2号

氏 名 キヤノン株式会社